

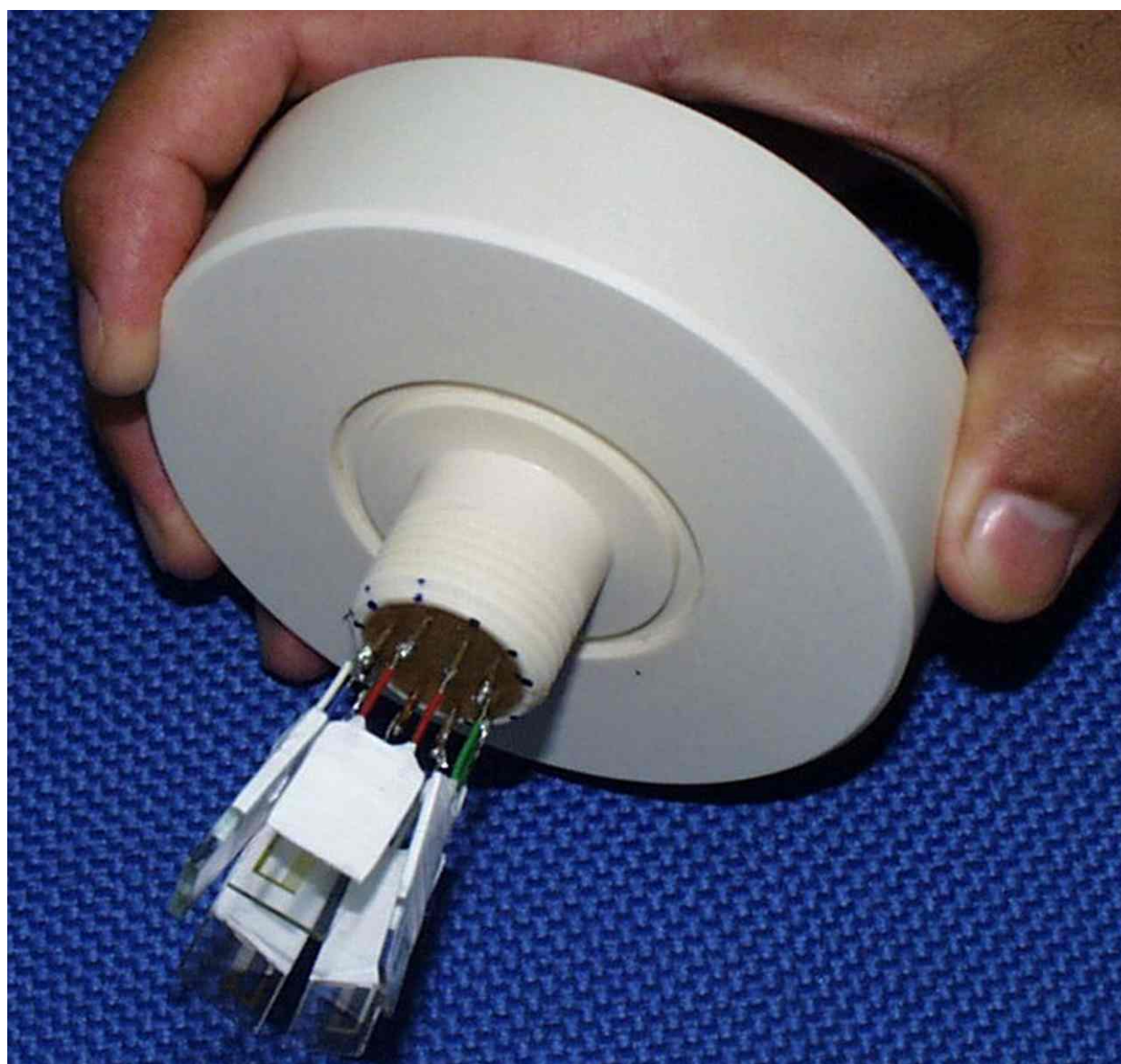
Documentos

ISSN 1518-7179

Novembro, 2007

32

Sistema Sensor para Detecção de Cianobactérias e Toxinas Relacionadas em Amostras Líquidas



ISSN 1518-7179

Novembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Documentos 32

Sistema Sensor para Detecção de Cianobactérias e Toxinas Relacionadas em Amostras Líquidas

Victor Bertucci Neto
Nelson Consolin Filho
Ednaldo José Ferreira
Armando Augusto Henriques Viera
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 3374 2477
Fax: (16) 3372 5958
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Foto da capa: Arquivo Embrapa
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2007): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

B552s Bertucci-Neto, Victor

Sistema Sensor para Detecção de Cianobactérias e Toxinas Relacionadas em Amostras Líquidas. / Victor Bertucci-Neto, Nelson Consolin Filho, Ednaldo José Ferreira, Armando Augusto Henriques Viera, Luiz Henrique Capparelli Mattoso. - São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007.

13 p. - (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, ISSN 1518-7179; 32).

1. Água Toxicologia. 2. Cianobactéria Detecção. 3. Cianotoxina Detecção. I. Consolin Filho, Nelson. II. Ferreira, Ednaldo José. III. Henriques Viera, Armando Augusto. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Título. VI. Série.

CDD 21 ED 571.95

© Embrapa 2007

Autores

Victor Bertucci Neto

Eng. Elétrica, Dr., Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP
victor@cnpdia.embrapa.br

Nelson Consolin Filho

Químico, Dr., bolsista de pós-doutorado
Depto. de Botânica UFSCar
consolin@cnpdia.embrapa.br

Ednaldo José Ferreira

Ciências da Computação, MSc.,
Embrapa Instrumentação Agropecuária,
C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP
ednaldo@cnpdia.embrapa.br

Armando Augusto Henriques Vieira

Botânico, Dr., Depto. de Botânica
Universidade Federal de São Carlos,
Rodovia Washington Luís, km 235,
CEP 13565-905, São Carlos, SP
ahvieira@power.ufscar.br

Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Eng. de Materiais, Dr, Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos (SP)
mattoso@cnpdia.embrapa.br

Apresentação

Nos últimos anos, devido principalmente às ações antrópicas, o florescimento de cianobactérias tóxicas em lagos, reservatórios e outros corpos d'água menores são cada vez mais freqüentes e maiores. Algumas espécies típicas de regiões tropicais também têm sido detectadas em regiões temperadas, provavelmente relacionadas com o aquecimento global. Um dos mais famosos casos comprovados de intoxicação com cianobactérias foi o que ocorreu em Caruaru, Pernambuco quando, em 1996, cerca 60 pacientes de hemodiálise faleceram quando água contaminada com microcistinas foi utilizada nas máquinas de diálise. Entretanto, a detecção destes organismos e suas toxinas é trabalhosa com um custo relativamente alto, não havendo ainda um equipamento portátil para medidas em campo. Por sua vez, a Embrapa Instrumentação Agropecuária desenvolveu um sistema sensor chamado de “língua eletrônica” que possui uma grande sensibilidade para detectar e classificar soluções orgânicas e inorgânicas, além de apresentar portabilidade, ou seja, pode ser acoplado em um sistema para medidas em campo. Estas características foram o ponto de partida para averiguar a possibilidade de detectar algumas espécies de cianobactérias e suas toxinas. Em um trabalho em parceria com o Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, foram investigadas estas possibilidades, sendo apresentados e discutidos alguns resultados nesta publicação.

Álvaro Macedo da Silva
Chefe Geral

Sumário

Introdução	9
Sensores para espectroscopia de impedância elétrica	10
Resultados experimentais e discussão	11
Preparação dos sensores	11
Obtenção das culturas de cianobactérias e toxinas relacionadas	11
Medidas de impedância elétrica	12
Conclusões	13
Referências	13

Sistema Sensor para Detecção de Cianobactérias e Toxinas Relacionadas em Amostras Líquidas

Victor Bertucci Neto
Nelson Consolin Filho
Ednaldo José Ferreira
Armando Augusto Henriques Viera
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Introdução

Nos últimos anos, devido principalmente a ações antrópicas, os blooms de Cianobactérias tóxicas em lagos, reservatórios e outros corpos d'água menores são cada vez mais freqüentes e maiores. O aparecimento relativamente rápido de grandes florescimentos de *C. raciborskii* em regiões temperadas levou vários autores a considerarem que a espécie, de origem tropical, está invadindo as regiões temperadas (BRIAND et al., 2004). O fato de esta última cianobactéria produzir massivas populações em regiões temperadas, onde antes da década de 90 do século passado não ocorria, leva, entretanto, a deduzir que além do homem, putativas mudanças climáticas globais são também alguns dos fatores que promovem o aumento dessas populações. Apesar de existirem relatos desde o século XIX de acidentes envolvendo cianobactérias tóxicas (ou cianofíceas, ou algas azuis, como também são conhecidas), o problema do aumento de florescimentos desses organismos nos mais variados corpos de água foi negligenciado até recentemente. Cianobactérias tóxicas em corpos d'água utilizados como fonte de água potável para populações humanas e para gado são potencial e extremamente perigosas e inúmeros acidentes por todo mundo são relatados na literatura especializada. Um dos primeiros relatos de acidente com esses organismos talvez seja aquele de Francis (1878), que descreve o envenenamento de pessoas e gado no lago Alexandrina (Austrália), e o causador seria um florescimento tóxico de *Nodularia* sp, uma cianobactéria reconhecidamente tóxica (CARMICHAEL et al., 1998). Muitos outros acidentes com cianobactérias tóxicas são descritos na literatura especializada, como a relatada relação do aumento da incidência de câncer no fígado em populações da China com florescimentos de cianobactérias tóxicas. Tanto a microcistina-LR (uma das várias microcistinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* mas também por outras espécies) quanto a nodularina, produzida por *Nodularia* sp, parecem induzir câncer hepático tanto em humanos quanto em ratos e em animais domésticos (YU, 1989; FALCONER, 1991; OHTA et al., 1994; UENO et al., 1996). Parece, também, haver relação entre certos surtos epidêmicos de gastroenterite no Norte e Nordeste do Brasil com florescimentos tóxicos de cianobactérias. Teixeira et al. (1993), relatam um caso de gastroenterite que vitimou cerca de 2000 pessoas, das quais 88 faleceram, causado por florescimentos de *Microcystis* sp e *Anabaena* sp no reservatório de Itaparica, Bahia.

Porém, o mais famoso dos acidentes relatados na literatura é o de Caruaru, Pernambuco quando, em 1996, cerca 60 pacientes de hemodiálise faleceram quando água contaminada com microcistinas foi utilizada nas máquinas de diálise (JOCHIMSEN et al., 1998).

Vários métodos podem ser eficazes na eliminação da maioria das cianotoxinas e o tratamento primário passa pela retirada das células, evitando sempre sua lise uma vez que as cianotoxinas são endocelulares e podem ser liberadas para a água, na qual são bastante solúveis, se as células forem destruídas. Por isso, a legislação nacional atual coíbe a utilização de algicidas, como o sulfato de cobre, diretamente no corpo d'água. Entretanto, se as cianotoxinas já estiveram dissolvidas, alguns tratamentos como a cloração, ozonização, radiação UV e ultra-filtração são de razoável eficiência. Contudo, tais tratamentos aplicados de modo contínuo em grandes volumes de água representam elevados custos e uma maneira de diminuí-los é o constante monitoramento das cianotoxinas nas águas. Neste ponto, surge um outro problema que é o processo relativamente demorado e razoavelmente caro se o monitoramento for de alta resolução, para detectar todos os tipos de cianotoxinas, pois tem que ser efetuado com análises por HPLC ou por imunoenaios tipo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), mais baratos mas pouco eficazes para a discriminação das várias cianotoxinas.

Dessa forma o desenvolvimento de uma metodologia aliada a um equipamento que possa monitorar as espécies das cianotóxicas pode impulsionar a solução de questões ambientais, seja na correção de superpopulações, seja na prevenção. Neste trabalho, financiado pela Embrapa, CNPq, e FAPESP, são apresentados alguns resultados que comprovam a possibilidade de detecção destes organismos, assim como das toxinas produzidas pelos mesmos. O princípio sensor da técnica é baseado em espectroscopia de impedância elétrica, comumente chamado de “língua eletrônica”.

Sensores para espectroscopia de impedância elétrica

A utilização de sensores baseados em medida de impedância elétrica para estimativa de concentrações e classificação de matérias componentes em amostras líquidas tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos. Comumente chamado de língua eletrônica (EMBRAPA, 2002), esses sensores têm sido aplicados para detecção, estimativa da concentração e controle da qualidade de bebidas como sucos, vinhos, água, e café (RIUL et al., 2002); MARTINEZ-MÁÑEZ et al., 2005), além da detecção do princípio ativo de certas substâncias encontradas em fármacos (RAHMAN et al., 2004). A base do sensor é um microeletrodo interdigitado de ouro construído sobre um substrato de vidro. A geometria do microeletrodo sugere um capacitor planar composto por dígitos (*fingers*) interpostos (igualmente separados) com dois terminais que permitem medidas da sua interação com o líquido. Um sistema sensor língua eletrônica é aquele que é capaz de produzir uma “impressão digital química” de um ambiente químico desconhecido em um líquido. Basicamente, este sistema é composto de um arranjo de sensores recobertos por uma ou mais camadas de materiais poliméricos cada um, sendo ligados a uma interface que faz a conversão analógica para digital do sinal elétrico. O sinal elétrico, por sua vez, é tratado em uma unidade de processamento previamente programada para o alvo em questão. Essa impressão digital constitui um padrão único que pode ser reconhecido e classificado por sistemas especializados para reconhecimento de padrões. O princípio de detecção é o de seletividade global (EMBRAPA, 2003) com aumento de seletividade e sensibilidade. Nesse contexto, métodos estatísticos e computacionais apresentam-se como soluções potenciais para o reconhecimento dos padrões gerados por uma língua eletrônica. Dentre eles destacam-se as Redes Neurais Artificiais (RNA), análise de componente principal, e algoritmos genéticos (FERREIRA, 2005). O sistema de medida é baseado na análise dos padrões de respostas obtidos pela aplicação de um sinal de corrente alternada aos sensores, com frequência e amplitude fixas, quando eles estão imersos em uma amostra líquida. A impedância elétrica resultante em cada sensor é usada como informação para detectar e classificar cada amostra desejada.

Resultados experimentais e discussão

Preparação dos sensores

A preparação dos sensores é feita através da deposição de uma ou mais camadas poliméricas em substrato de vidro que já contém eletrodos de ouro depositados. Todos os filmes foram fabricados pela técnica de automontagem (*self assembly*). Na Figura 1 são apresentados os espectros de absorbância na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) dos filmes de POEA (poli o-etoxianilina), com 1×10^{-3} M em pH 3, variando-se apenas o número de camadas depositadas.

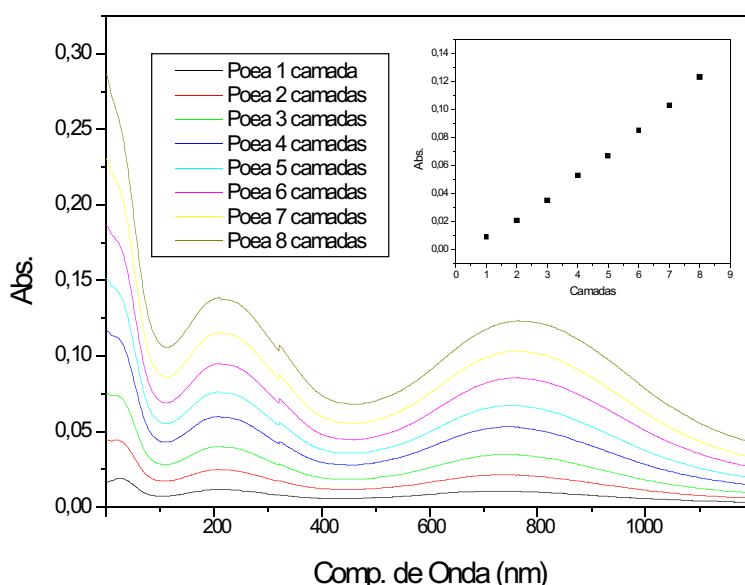


Fig. 1- Espectros de absorção UV-Vis para os filmes de POEA (1×10^{-3} M, pH 3) em várias camadas depositadas por automontagem

A partir da Figura 1, observa-se que há um crescimento do filme a cada camada de POEA depositada. Nota-se claramente a presença da banda polarônica da POEA, a qual indica que ocorre o crescimento do filme, no seu estado dopado por volta de 800 nm. Vê-se também que a quantidade de material depositado cresce linearmente em função do número de camadas depositadas, indicando que cada camada depositada contribui com uma quantidade praticamente igual do material para o filme.

Obtenção das culturas de cianobactérias e toxinas relacionadas

As cianobactérias, comprovadamente tóxicas, empregadas neste trabalho são: *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix tropicalis*. Os organismos foram isolados do reservatório de Barra Bonita (SP) e estão sendo mantidos, como cepas unialgais em fase de axenização, no acervo da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da UFSCar. (WWCM 835). Os organismos foram cultivados em garrações pirex com *vent-caps*, de 20 litros de capacidade e com 18 litros de meio de cultura específico. No final da fase exponencial do crescimento de cada cultura, 30 a 50 dias, as células foram separadas dos meios de cultura por filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poros de $0,65\mu\text{m}$. As células da cada organismo foram suspensas em água deionizada e desintegradas por sonificação. Os extratos de cada espécie foram mantidos resfriados a 4°C até o momento de serem analisados pelos sensores.

Medidas de impedância elétrica

A partir de um conjunto de sensores previamente montados foram organizadas as medidas de impedância (parte capacitiva e resistiva) com frequência do sinal igual a 1 KHz, valor no qual ocorreu maior sensibilidade em relação à amostra (Bertucci-Neto et al., 2007a, 2007b). Foi usado o equipamento analisador de impedância por ganho e fase, marca Solartron, modelo SI 1260, com um multiplexador para medidas em 10 sensores. As amostras usadas nos experimentos tinham concentração máxima igual a 8 Giga células por litro e também foram diluídas em concentrações de 80%, 60%, 40%, e 20% do máximo, respectivamente, sendo comparadas com água pura deionizada. Em seguida foram misturadas as amostras em duas a duas, três a três, e assim sucessivamente até serem feitas as medidas com todos os tipos de cianobactérias na mesma amostra. Essas medidas foram reconfirmadas para análise da repetibilidade do sistema. Os dados foram compatibilizados de forma que se verificassem agrupamentos após o processamento através de Análise da Componente Principal (PCA). A Figura 2 mostra o resultado da aplicação do PCA em amostras com concentração máxima dos organismos *Anabaena spiroides* (A), *Cylindrospermopsis raciborskii* (C), *Microcystis aeruginosa* (M), e *Planktothrix tropicalis* (P). Nesta figura podem ser verificados os agrupamentos resultantes dos dados de 10 sensores para cada amostra, havendo, entretanto uma tendência de agrupamento entre C e P.

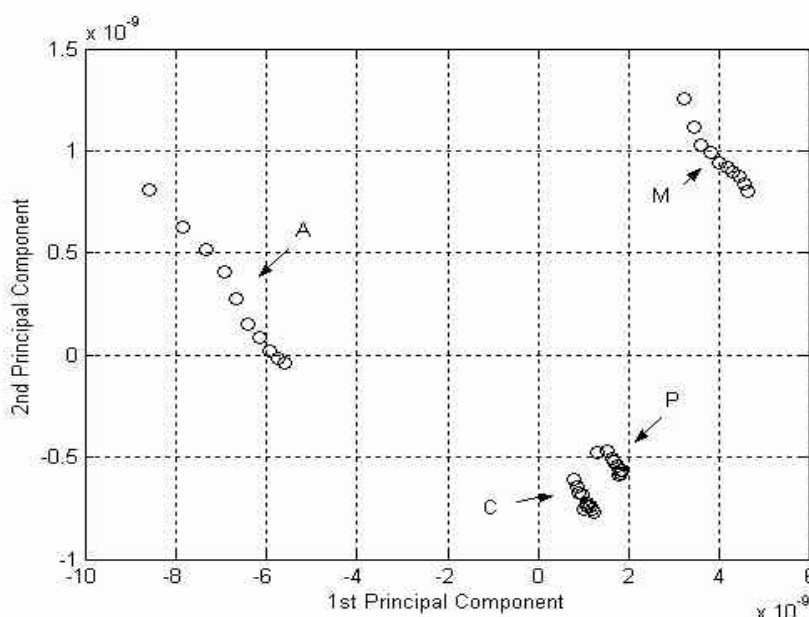


Fig. 2 - Gráfico de primeira e segunda componentes principais com as espécies vivas de A, M, C, e P, em concentração máxima (100%).

A Figura 3 mostra o gráfico de PCA com os dados de medida em amostras com células mortas em concentração máxima. Neste caso, o interesse está em verificar a capacidade de detectar as toxinas relacionadas a cada organismo. Verifica-se que os dados de 10 sensores são fortemente agrupados com tendência vertical para cada toxina referente a cada organismo. Novamente repetiu-se a tendência de agrupamento entre P e C.

Por sua vez, a Figura 4 mostra o diagrama de PCA das 4 espécies mortas, quando foram coletados os dados em concentração máxima (100%), e a 80%, 60%, e 40% de diluição. Observa-se que, à exceção da espécie M, quando se diluem mais as amostras existe uma tendência maior de agrupamento de todos os dados devido à diminuição de sensibilidade da medida.

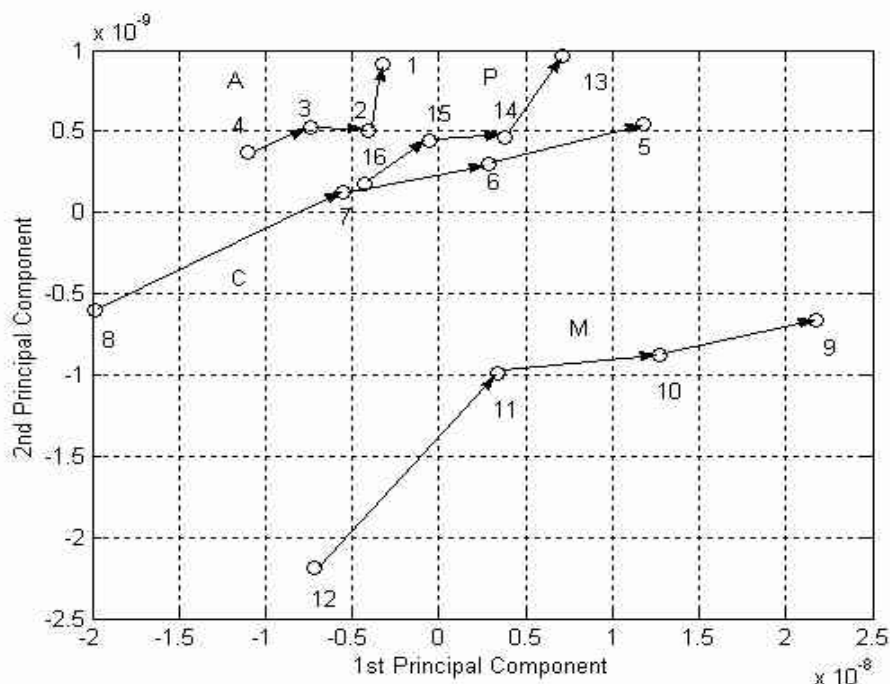


Fig. 4 - Diagrama de PCA para concentrações variadas de cada espécie morta. Espécie A: 4; 3, 2, 1; espécie C: 8; 7, 6, 5; espécie M: 12, 11, 10, 9; espécie P: 16, 15, 14, 13; concentrações de 100%, 80%, 60%, e 40%, respectivamente.

Conclusões

Os resultados mostram que o sistema sensor pode discriminar razoavelmente as quatro espécies de cianobactérias analisadas. A primeira componente principal contém mais de 99% de toda a informação em todos os diagramas apresentados, mostrando a viabilidade de detecção de cada espécie amostrada. Os casos em que ocorreu aproximação entre os agrupamentos de espécies diferentes (*Cylindrospermopsis raciborskii* e *Planktothrix tropicalis*) podem ser evitados através da revisão das técnicas de classificação e melhoria da sensibilidade do sistema sensor. É interessante observar também que os sensores não foram previamente preparados para detectar qualquer uma das espécies, ou seja, espera-se que através da inclusão de substâncias relacionadas às toxinas possa-se aumentar a sensibilidade e conseqüentemente a capacidade de seleção do sistema.

Referências

- BERTUCCI-NETO, V.; CONSOLIN FILHO, N.; FERREIRA, E. J.; VIERA, A. H.; MATTOSO, L. H. C. New sensor for quick detection of dissolved organic matter toxins released by some Cyanobacteria. In: SETAC EUROPE 17TH ANNUAL MEETING, Porto, Portugal, 20-24 May 2007. [S. l.: s. n.], 2007a.
- BERTUCCI-NETO, V.; CONSOLIN FILHO, N.; FERREIRA, E. J.; VIERA, A. H.; MATTOSO, L. H. C. Sensor for Identification of Toxins and Dissolved Organic Matter from Cyanobacteria. INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC CYANOBACTERIA, 7th., Rio das Pedras, Rio de Janeiro, Brazil, 21-24 august 2007. [S. l.: s. n.], 2007b.
- BRIAND, J. F.; LEBOULANGER, C.; HUMBERT, J. F. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming? **Journal of phycology**, Lawrence, v. 40, p. 231-238, 2004.

CARMICHAEL, W. W.; ESCHEDOR, J. T.; PATTERSON, G. M. L.; MOORE, R. E. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L 575 from New Zealand. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 54, p. 2257-2263, 1998.

EMBRAPA. Luiz Henrique Capparelli Mattoso; Carlos Manoel Pedro Vaz; Nelson Consolin Filho; Everaldo Carlos Venâncio; Leonardo Giordano Paterno. **Sensor de pasta de carbono combinada com polímeros para a detecção de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em líquidos e processo de fabricação de sensor**. BR n. PI0306836, 5 set. 2003.

EMBRAPA. Everaldo Carlos Venancio; Ladislau Martin Neto; Antonio Riul Júnior; Fernando Josepetti; Luiz Henrique Capparelli Mattoso; Sarita Vera Mello; David Martin Taylor. **Sensor para análises de misturas por seletividade global e seu uso em sistema sensorial**. BR n. PI 0200409-7, 30 jan. 2002.

FALCONER, I. R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental toxicology and water quality**, New York, v. 6, p. 177-184, 1991.

FERREIRA, J. E. **Abordagem genética para seleção de um conjunto reduzido de características para construção de ensembles de redes**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Computação e Matemática Computacional) - Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo -ICMC-USP, São Carlos.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, London, v. 18, p. 11-12, 1878.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T., HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C. ; DE MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M. ; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 338, p. 873-888, 1998.

MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; SOTO, J.; GARCIA-BREIJO, E.; GIL, L.; IBÁÑEZ, J.; LLOBET, E. An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 104, p. 302-307, 2005.

OHTA, T.; SUEOKA, E.; IIDA, N.; KOMORI, A.; SUGANUMA, M.; NISHIWAKI, R.; TATEMATSU, M.; KIM, S. J.; CARMICHAEL, W. W. ; FUJIKI, H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, p. 6402-6406, 1994.

RAHMAN, A. S. A. et al. A microcontroller-based taste sensing system for the verification of *Eurycoma longifolia*. **Sensors and actuators B**, Lausanne, v. 101, p. 101-109. 2004.

RIUL, J. R. A. et al. Artificial tast sensor: efficient combination of sensors made from langmuir-blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer. **Langmuir**, Washington, v. 18, p. 239-245, 2002.

TEIXERA, M.; COSTA, M.; CARVALHO, V.; PEREIRA, M.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull Pan Am Health Org**, [S. l.], v. 27, p. 244-253, 1993.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F.; PARK, H. D.; CHEN, G. C.; CHEN, G. ; YU, S. Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 17, p. 1317-1321, 1996.

YU, S. Z. Drinking water and primary liver cancer.1989. In: TANG, Z. Y.; WU, M. C.; XIA, SS. (Ed.). **Primary Liver Cancer**. New York: China Academic Publishers/Springer, 1989. p. 30-37.

WEYHENMEYER, G. A. Warmer winters are planktonic algal populations in Sweden largest lakes affected? **Ambio**, Stockholm, v. 30, p. 565-571, 2001.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP

Telefone: (16) 3374 2477 - Fax: (16) 3372 5958

www.cnpdia.embrapa.br - sac@cnpdia.embrapa.br

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

